

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor Prof..Dr. N. Zöllner

Methodik und Ergebnisse zur Bestimmung von
Oxipurinol im Serum und Urin nach Verabrei-
chung von Allopurinol

Inaugural - Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Raimund Wiesbeck
aus München

1976

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor Prof. Dr. N. Zöllner

Methodik und Ergebnisse zur Bestimmung von
Oxipurinol im Serum und Urin nach Verabrei-
chung von Allopurinol

Inaugural - Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Raimund Wiesbeck
aus München
1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr.med. W.Kaiser

Mitberichterstatter: Prof. Dr.med N.Zöllner

Dekan: Prof. Dr.med. W.Spahn

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Oktober 1976



Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. <u>Einleitung</u>	1
II. <u>Methodik</u>	8
1. Reagentien	
2. Versuchspersonen	
3. Versuchsanordnung	
4. Harnsäurebestimmung	
5. Bestimmung von Oxipurinol im Serum und im Urin	
III. <u>Ergebnisse</u>	19
1. Verhalten der Serumharnsäure	
2. Verhalten der Oxipurinolspiegel im Serum	
3. Verhalten der Oxipurinolspiegel im Urin	
4. Verhalten der Harnsäure- und Oxipurinol- spiegel im Serum von Patienten	
IV. <u>Diskussion</u>	
1. Einleitung	
2. Methodik	
3. Ergebnisse	
V. <u>Zusammenfassung</u>	
VI. <u>Abbildungen</u>	
VII. <u>Literaturverzeichnis</u>	
VIII. <u>Lebenslauf</u>	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553810_0028

I. Einleitung

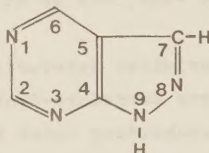
- 1.1 Erhöhungen der Serum-Harnsäure sind gekennzeichnet durch eine positive Harnsäure-Bilanz. Es gibt verschiedene Wege, wie es zu einer Hyperuricämie kommt:
- a. Bei der primären Hyperuricämie liegt entweder eine gesteigerte Harnsäure-Synthese vor oder die Harnsäure-Ausscheidung durch die Nieren ist gestört. Auch eine Kombination beider Vorgänge ist möglich.
 - b. Von sekundärer Hyperuricämie spricht man, wenn die Erhöhung der Serum-Harnsäure durch gesteigerten Auf- und Abbau von Nukleoproteiden, z.B. bei Polycythämie, chronisch myeloischer Leukämie, oder auch bei Zytostatika-Gabe zustande kommt.
 - c. Kommt es bei einer Hyperuricämie zur Ablagerung von Harnsäure-Kristallen in verschiedenen Geweben und als deren Folge zu Arthritiden, Gichtniere und Tophi, liegt eine Gicht vor.
- 1.2 Harnsäure entsteht im Stoffwechsel beim Abbau der Purinnukleotide. Diese werden dephosphoryliert, desaminiert, gespalten und im letzten Schritt durch die Xanthinoxidase zu Harnsäure oxydiert.

2. Allopurinol

Die größte klinische Bedeutung zur Senkung des Harnsäure-Spiegels hat Allopurinol gewonnen.

2.1 Chemie

Allopurinol ist ein Hypoxanthin-Analogen. Es hat folgende chemische Struktur:



Der Stickstoff und die C-H-Gruppe an Stelle 7, 8 im Puringerüst des Hypoxanthins sind gegeneinander ausgetauscht.

2.2 Metabolismus

Allopurinol wird zum geringeren Teil (3-10%) renal eliminiert, der größere Teil (70%) wird durch die Xanthinoxidase in das Xanthinanaloge Oxipurinol umgewandelt. Ein weiterer Weg ist die Umwandlung durch die Purin-Nukleosid-Phosphorylase mit Ribose-1-Phosphat in Allopurinol-1-N-Ribonucleosid und vermutlich durch HG-PRTase weiter zum Nukleotid. (1,2)

Oxipurinol wird größtenteils unverändert über die Niere ausgeschieden, ein geringer Teil wird durch die Pyrimidin-Nukleosid-Phosphorylase zu Oxipurinol-1-N-Ribonukleosid umgewandelt. Außerdem wurden in Rattengewebe Oxipurinol-7-N-Ribonukleotide und Oxipurinol-1-N-Ribonukleotide nachgewiesen (2).

Bei diesen Umwandlungen wird an verschiedenen Stellen Phosphoribosyl-Pyrophosphat verbraucht.

2.3 Pharmakokinetik

1) Allopurinol

Oral verabreichtes Allopurinol wird rasch aus dem Darm resorbiert. Seine Halbwertszeit im Serum beträgt zwei bis drei Stunden (1). 3 - 10 % der gegebenen Menge werden unverändert, etwa 70 % als Oxipurinol und der Rest als andere Metabolite (geschützt Allopurinol-1-N-Ribonucleosid) im Urin ausgeschieden. (2)

Versuche mit radioaktiv markiertem Allopurinol zeigten, daß nach intravenöser Gabe einer Einzeldosis des Natriumsalzes nach einer Stunde bereits 65 % der Radioaktivität und nach sechs Stunden 100 % der noch im Serum vorhandenen Radioaktivität in der Oxipurinolfraktion aufzufinden waren, d.h. Allopurinol ist bei einmaliger intravenöser Gabe nach sechs Stunden nicht mehr im Serum nachweisbar. Bei oraler Verabreichung von ^{14}C -Allopurinol war in den ersten 30 Minuten keine Radioaktivität im Serum nachweisbar, nach einer Stunde war der Hauptanteil der Aktivität noch in der Allopurinolfraktion, sechs Stunden später konnte nur noch radioaktives Oxipurinol sowohl im Serum als auch im Urin bestimmt werden. (3)

2) Oxipurinol

Aus den Versuchen mit markiertem Allopurinol konnte für Oxipurinol eine Halbwertszeit im Plasma von 28 Stunden (1) und eine renale Clearance von 15 ml/Min. berechnet werden. Oxipurinol wird aus den Nierentubuli reabsorbiert, es verhält sich bei seiner renalen

Ausscheidung ähnlich der Harnsäure (4). Uricosurica (z.B. Probenecid) steigern die Oxipurinolausscheidung.

Allopurinol und Oxipurinol sind im Plasma nicht an Eiweiß gebunden (5) und verteilen sich im gesamten Extrazellulärraum mit Ausnahme des Liquors. Im Liquor ist die Konzentration etwa 50 % derjenigen des Serums. (3)

3. Mechanismen der Senkung des Harnsäure-Spiegels durch Allopurinol

- 3.1 Der am längsten bekannte Mechanismus beruht auf der oben erwähnten Analogie zu Hypoxanthin. Die Xanthinoxidase, die die Umwandlung von Hypoxanthin in Xanthin und weiter in Harnsäure katalysiert, wird von Allopurinol kompetitiv gehemmt. Dabei wird Allopurinol in Oxipurinol (Xanthinanalogue) umgewandelt. Oxipurinol hemmt die Xanthinoxidase ebenfalls.

Dieser Teil der Wirkung greift also in den Purinkatabolismus ein.

- 3.2 Rundles et al. stellten 1963 eine Diskrepanz zwischen der Gesamtpurinexkretion vor der Behandlung und der Exkretion während der Allopurinol-Behandlung fest (Harnsäure und Oxipurine) (6). Zwischen 1963 und 1966 wurde von Rundles, Delbarre, Hitchings und Emmerson durch Bilanzrechnungen, ¹⁴C-Einbau usw. die Vermutung bestätigt, daß Allopurinol bzw. seine Metabolite auch in die de-novo-Purinsynthese eingreifen (6,7,8,9).

Die Schritte in der de-novo-Synthese, bei denen Allopurinol und seine Metabolite nach heutiger Kenntnis ansetzen, seien hier nur kurz erwähnt:

- a. Beim ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt entsteht aus PRPP und Glutamin durch die PRPP-Amidotransferase 5-P-Ribosylamin und über weitere enzymatische Schritte Inosinsäure (IMP).
 - b. Die HG-PRTase katalysiert die Umwandlung von Hypoxanthin und Guanin in IMP und GMP, die Adenin-Phosphoribosyl-Transferase die Umwandlung von Adenin in AMP.
- Bei allen drei Reaktionen wird PRPP verbraucht.

3.3 Für die Hemmung der de-novo-Purinsynthese kommen nun mehrere Mechanismen in Frage:

- a. Substratverarmung von PRPP

Der vermehrte Verbrauch von PRPP durch die Bildung von Allopurinol- und Oxipurinol-Nukleotiden sowie durch die Umwandlung des sich anhäufenden Hypoxanthin zu IMP führt zu einem Mangel an intracellulärem PRPP, das Substrat des ersten Schritts in der Purinsynthese ist (10). Da das PRPP die Geschwindigkeit der Reaktion bestimmt, kommt es so zu einer Verminderung der Purinsynthese.

- b. Feedback-Hemmung auf die PRPP-Amido-Transferase durch natürliche Ribonukleotide

Das durch die Hemmung der Xanthinoxidase sich anhäufende Xanthin und Hypoxanthin wird im Reutilisationsstoffwechsel zu IMP und weiter zu GMP und AMP umgewandelt. Diese Nukleotide hemmen ebenfalls den ersten Schritt, die PRPP-Amidotransferase-Reaktion.

c. Pseudo-Feedback durch Allopurinol- und Oxipurinol-
Nukleotide

Auch die entstehenden Oxipurinol- und Allopurinol-Nukleotide üben durch allosterische Mechanismen diese Feedbackhemmung auf den ersten Schritt aus (11,12,13,14).

4. Die Wirkung von Allopurinol kann also nicht allein mit der Xanthin-Oxidase-Hemmung erklärt werden. Für die darüber hinausgehenden Einflüsse auf die Harnsäure spielen Oxipurinol und die Ribonukleotide von Allopurinol und Oxipurinol eine große Rolle. Da nun bekannt ist, daß die Halbwertszeit von Oxipurinol wesentlich länger ist als die von Allopurinol, wurde in letzter Zeit begonnen, statt der bisher üblichen Verteilung der Tagesdosis auf mehrere Einnahmen die gesamte Tagesdosis, z.B. 300 mg, als Einzeldosis am Morgen zu geben.

Ob und inwieweit sich dadurch das Tagesprofil des Serum-Harnsäure-Spiegels ändert, wurde bereits von verschiedenen Gruppen untersucht.

Um eine genauere Aussage machen zu können über die pharmakokinetischen Abläufe, die die einmalige tägliche Dosierung von Allopurinol rechtfertigen, haben wir zusätzlich zum Harnsäurespiegel im Serum den Oxipurinolspiegel im Serum und außerdem die Oxipurinolausscheidung im Urin gemessen.

Die Oxipurinolbestimmung im Serum und im Urin wurde in Anlehnung an eine von Elion et al. (1b, 4) entwickelte Methode durchgeführt.

II. Methodik

1. Reagentien

Alle Reagentien waren von höchster Reinheit. Die Säulenmaterialien wurden von den Firmen Bio Rad Laboratories (Bio Gel P2, 50-100 mesh) und Serva, Heidelberg (Dowex, 1x8, 200-400 mesh, Gegenion HCOO^-) bezogen. Die Kieselgel-Dünnschichtplatten mit Fluoreszenzindikator F 254 waren von der Firma Merck. Allopurinol und Oxipurinol als Reinsubstanz erhielten wir von der Firma Henning, Berlin.

2. Versuchspersonen

- 2.1 Die Versuche wurden an zwei freiwilligen, gesunden, männlichen Probanden durchgeführt. Die Serum-Harnsäure lag bei beiden im Normbereich.
- 2.2 Zusätzlich stellten sich zehn Patienten mit einer primären Hyperuricämie zur Verfügung. Ihre Harnsäurewerte lagen vor Versuchsbeginn zwischen 7,1 und 10,45 mg %.

3. Versuchsanordnung

3.1 Versuch a:

Zuerst nahmen die zwei freiwilligen Versuchspersonen 13 Tage lang dreimal pro Tag 100 mg Allopurinol. Im Abstand von fünf Stunden wurden jeweils zur Allopurinol-Einnahme vom ersten bis zum sechsten Tag einschließlich sowie am 13. Tag 20 ml Blut aus einer Kubitalvene zur Harnsäure- und Oxipurinolbestimmung entnommen.

3.2 Versuch b:

Drei Wochen später bekamen die Probanden 13 Tage lang morgens eine Einzeldosis von 300 mg Allopurinol. Im Abstand von fünf Stunden wurden die ersten sechs Tage und am 13. Tag je 3x20 ml Blut aus der Vena cubitalis entnommen. Die erste Blutentnahme am Tag erfolgte jeweils zum Zeitpunkt der Allopurinol-Einnahme.

Zu beiden Versuchen wurde bei einem Probanden zusätzlich am 14., beim anderen am 14. und 15. Tag morgens Blut entnommen.

3.3 Die zehn Gichtpatienten nahmen nach einer Vorperiode von einer Woche 1x300 mg Allopurinol täglich. Venöse Blutentnahmen erfolgten um 9^h und 19^h. Da zu Einzelbestimmungen zuwenig Serum zur Verfügung stand (notwendige Menge 8-10 ml), wurde von jedem Patienten-Serum 1 ml genommen und die Oxipurinolkonzentration der gepoolten Seren bestimmt.

4. Harnsäurebestimmung

Doppelbestimmungen der Serum-Harnsäure wurden enzymatisch mit Uricase nach der Methode von Zöllner (15) durchgeführt.

5. Bestimmung von Oxipurinol im Serum und im Urin

5.1 Vorbemerkung

Oxipurinol kann als Reinsubstanz quantitativ im Photometer bestimmt werden. Die Untersuchung des Absorptionsspektrums von Oxipurinol (Abb. 1,2,3) zeigt zwei Maxima von unterschiedlicher Höhe bei 242,5 und 265 nm. Bei diesen Wellenlängen ist die

Konzentration von Oxipurinol proportional zur Extinktion. Abb. 4 zeigt eine Eichkurve mit Konzentrationen von 0-120 µg.

Oxipurinol ist in Glycinpuffer (pH 10,4; 0,1 mol) gelöst und gegen diesen als Leerwert gemessen.

Die Absorptionsmaxima und -minima anderer Purine und Purinanaloge sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

	Maxima (nm)	Minima (nm)
Harnsäure	283	255
Allopurinol	250	235
Xanthin	262	240
Hypoxanthin	248	215
Allantoin	-	-

Bei gleicher molarer Konzentration beträgt jedoch die Absorption von Allopurinol bei 250 nm nur etwa ein Viertel der Absorption von Oxipurinol bei 242,5 nm. Dieser Umstand ist von Vorteil bei der Bestimmung der Absorptionsänderungen im Verlauf von säulenchromatographischen Isolierungen, außerdem können von Oxipurinol geringere Mengen noch bestimmt werden.

Zur Isolierung von Oxipurinol aus dem Serum bzw. Urin sind mehrere Arbeitsgänge notwendig. Das Serum wird zuerst enteiweißt, die Fraktion der Purine und Purinanalogen an einem Ionenaustauscher vorgetrennt, konzentriert und schließlich durch Dünnschichtchromatographie in die Einzelsubstanzen aufgeteilt. Diese können nach Elution im Photometer quantitativ bestimmt werden.

5.2 Enteiweißung

Da Oxipurinol nicht an Eiweiß gebunden ist (5), kann es säulenchromatographisch mit Bio Gel -P-2 (mesh 50-100) vom Protein getrennt werden. Bei diesem Säulenmaterial handelt es sich um ein zerkleinertes Polyacrylamidgel von festem Vernetzungsgrad. Es läßt große Moleküle rasch passieren und hält Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von etwa 1600 zurück. (Das Säulenmaterial wird häufig zum Entsalzen von Proteinlösungen benutzt.)

5.2.1 Herstellung der Säule

Das Granulat wird zuerst in aqua dest. gewaschen und dann in Puffer zum Quellen gebracht. Nach Entgasung füllt man das Material luftblasenfrei in eine Säule von 80 cm Höhe und 2,5 cm Durchmesser. Anschließend wird die Säule über eine Rollpumpe mit Puffer aequilibriert. Sie ist gebrauchsfertig, wenn das pH des Eluats dem pH-Wert des Puffers entspricht und die Null-Linie des Photometers konstant bleibt.

5.2.2 Registrierung

Das Eluat passiert eine Durchlaufküvette, die Absorption bei 252 nm wird fortlaufend in einem Beckmann Doppelstrahlphotometer gegen Puffer registriert. An das Photometer ist ein Kompensationsschreiber mit linearer Aufzeichnung angeschlossen. (Abb. 5,6,7)

5.2.3 Auftrag

10 ml Serum bzw. 1 ml Urin werden mit 1 n NaOH auf pH 9,3 eingestellt und über die Rollenspumpe aufgetragen.

5.2.4 Versuche mit verschiedenen Puffern

a. Glycinpuffer (10 mmol; pH 9,3)

Mit diesem Puffer werden Harnsäure, Allopurinol und Oxipurinol in einer Fraktion vollständig vom Protein getrennt. Hypoxanthin und Xanthin wurden nicht geprüft (Abb.8).

b. Phosphatpuffer (10 mmol; pH 7)

Dieser Puffer trennt Harnsäure (bzw. Allantoin, s.u.), Allopurinol und Oxipurinol fraktioniert auf, die einzelnen Peaks sind jedoch nicht vollständig voneinander getrennt. Hypoxanthin und Xanthin sind im Bereich des Harnsäure-Peaks mit-enthalten (Abb. 5). Da Allopurinol nur eine geringe Extinktion zeigt, kann die Fläche des letzten Peaks näherungsweise als Maß für die Oxipurinolkonzentration genommen werden.

c. Andere Puffer

Weitere Versuche, Oxipurinol von den übrigen Substanzen vollständig zu trennen (pH-Änderung des Puffers, Änderung der Molarität, Gradienten) brachten keine besseren Ergebnisse.

5.2.5 Entfernung der Harnsäure mit Uricase

10 ml Serum stellt man mit 1 n NaOH auf pH 9,3 ein und pipettiert 7,5 IE Uricase (gelöst in 0,66 Mol Glycinpuffer pH 9,3) dazu. Das Gemisch läßt man einige Stunden (je nach Menge der Harnsäure) bei 37° C stehen. Danach kann es auf die Bio Gel-Säule aufgetragen werden.

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß die Harnsäure als die größte Purinfraktion bei den weiteren Arbeitsgängen nicht mehr stört, da das Umwandlungsprodukt Allantoin an der Dowex-Säule nicht hängen bleibt. Damit ist die Auftragsmenge auf die Dünnschichtplatte geringer, und es ist gewährleistet, daß das gesamte Oxipurinol vom Auftragsort eluiert wird. Außerdem werden bei der photometrischen Registrierung des Eluats der Bio Gel-Säule Fraktionen sichtbar, die durch den Harnsäurepeak verdeckt wären.

5.3. Vorfraktionierung und Konzentrierung

Dieser Arbeitsgang erfolgt über einen Dowex-1X8-Ionenaustauscher, 200-400 mesh, Formiatform.

5.3.1 Herstellung

Das Säulenmaterial wird mehrfach in aqua dest. gewaschen; dabei werden die kleinen Partikel dekantiert. Anschließend wird es je zweimal mit 4 n NaOH und mit 4 n Ameisensäure umgeladen, entgast und in der Formiatform in eine Chromatographie-Säule (30 cm Länge; 1,2 cm Durchmesser) bis auf eine Höhe von 5 cm gefüllt. Danach wird mit aqua dest. gewaschen.

5.3.2 Auftrag

Aufgetragen wird die Oxipurinolfraction des Eluats der Bio Gel-Säule. Die Dowex-Säule kann, um Zeit zu sparen, in Serie hinter diese angeschlossen werden. Die Oxipurinolfraction enthält noch geringe Konzentrationen von Allopurinol, Allantoin (bzw. Harnsäure), Hypoxanthin und Xanthin. Der Ionenaustauscher ändert während des Auftrags sein pH, die Funktion wird dadurch jedoch nicht beeinträchtigt.

5.3.3 Versuche zur Prüfung der Affinität der einzelnen Substanzen zur Dowex-Säule

Oxipurinol, Xanthin und Harnsäure werden quantitativ an das Säulenmaterial gebunden, während Allantoin und Hypoxanthin nicht gebunden wird. Allopurinol wird nur zu einem geringen Teil vom Ionenaustauscher absorbiert.

5.3.4 Elution und Konzentrierung der isolierten Fraktion

Nach dem Auftrag wird die Säule mit 30 ml aqua dest. gewaschen und mit 0,25 n Ameisensäure eluiert, bis die photometrische Anzeige nur noch die Eigenextinktion der Ameisensäure zeigt. Das Eluat (ca. 50 ml) wird in einem 250 ml fassenden Rundkolben aufgefangen und mit dem Rotationsverdampfer bei 60 - 70° C eingedampft. Den trockenen Rückstand löst man in 2 ml aqua dest. und spült nochmals mit 1 ml aqua dest. nach. Die gesamten 3 ml werden in einem 25 ml-Spitzkolben abermals einrotiert und der Rückstand in 0,1 ml (bzw. 0,25 bei Urin) Glycinpuffer (Sörensen; 0,1 mol; pH 10,4) unter Schütteln gelöst. Je 0,05 ml dieser Lösung werden auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen.

5.4. Zur Trennung von Oxipurinol, Allopurinol, Harnsäure, Hypoxanthin und Xanthin auf Dünnschichtplatten

Als Dünnschichtplatten wurden DC-Kieselgel-Fertigplatten 60_{F254}, 20x20 cm; 0,25 mm Dicke, der Firma Merck benutzt. Die Platten wurden vor dem Auftrag 10 Minuten bei 110° C aktiviert. Durch den Fluoreszenz-Indikator sind die Banden der Purine unter der Quarzlampe sichtbar.

- 5.4.1. Bei den ersten Versuchen zur Trennung eines Purin-gemisches, das aus Harnsäure, Hypoxanthin, Xanthin, Oxipurinol und Allopurinol bestand, benutzten wir folgendes Laufmittel:

86 Teile n-Butanol
7 Teile Methanol
7 Teile H₂O
4 Teile konzent. Ammoniak

Mit diesem Laufmittel bleibt die Harnsäure an der Auf-tragsstelle liegen, Allopurinol läuft am schnellsten. Oxipurinol, Hypoxanthin und Xanthin werden nur unvoll-ständig getrennt.

RF-Werte: Allopurinol	0,67
Oxipurinol	0,45
Hypoxanthin	0,45
Xanthin	0,34
Harnsäure	0,00

- 5.4.2 Mit einem ähnlichen Laufmittel, bei dem statt Ammoniak konzentrierte Salzsäure dazugegeben wurde, wurden Allopurinol und Oxipurinol als gemeinsame Bande von den übrigen Purinen getrennt.

RF-Werte: Allopurinol	0,72
Oxipurinol	0,72
Hypoxanthin	0,46
Xanthin	0,00-0,46 (schließt)
Harnsäure	0,00

- 5.4.3 Durch eine kombinierte Nutzung der jeweiligen Vorteile der beiden Laufmittel konnte eine vollständige Trennung aller Substanzen erreicht werden:
Die Dünnschichtplatte wird nach dem Auftrag der Substanzen zehn Minuten lang in eine Kammer gestellt, deren Boden mit konzentrierter Ammoniaklösung bedeckt ist, ohne daß das Gel in die Lösung eintaucht. Der Ammoniakdampf schlägt sich auf der Platte nieder. Anschließend wird die Platte herausgenommen, umgedreht und in eine zweite Kammer gestellt. Diese enthält als Laufmittel:

86 Teile n-Butanol
7 Teile Methanol
10 Teile H₂O
1 Teil konzent. HCl

Laufzeit 1,5 bis 2 Stunden
bis zur halben Plattenhöhe.

Mit dieser Methode können alle Substanzen eindeutig getrennt werden. Die Lage der Bande von Oxipurinol zwischen Hypoxanthin und Allopurinol wird durch den Säureanteil des Laufmittels bestimmt: Je saurer das Laufmittelgemisch ist, desto näher liegt Oxipurinol an Allopurinol.

RF-Werte: Allopurinol	0,64
Oxipurinol	0,49
Hypoxanthin	0,34
Xanthin	0,22
Harnsäure	0,00

5.4.4 Photometrische Bestimmung

Die Platte wird getrocknet und die Oxipurinol-Bande unter der UV-Lampe gekennzeichnet. Das Gel wird abgekratzt, in 10 ml Glycinpuffer gelöst, zentrifugiert, und die Extinktion des Überstandes wird gegen Glycinpuffer als Leerwert bei 242,5 nm im Photometer bestimmt. Die Konzentrationen ($\mu\text{g}/10 \text{ ml}$) werden auf einer entsprechenden Eichkurve (Oxipurinolverdünnungen in 10 ml Glycinpuffer gegen Glycinpuffer als Leerwert) abgelesen und mit dem Faktor 2 multipliziert, da nur die Hälfte der Lösung auf die Dünnschichtplatte aufgetragen wurde.

5.4.5 Oxipurinolbestimmung im Urin

Der Arbeitsgang ist prinzipiell der gleiche wie oben. Wegen der höheren Oxipurinolkonzentration im Urin wurde nur 1 ml Urin verarbeitet, der eingedampfte Rückstand in 0,25 ml Glycinpuffer gelöst und wiederum nur 0,05 ml der Lösung auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Die aus der Eichkurve abgelesenen Konzentrationen ($\mu\text{g}/\text{ml}$) waren also in diesem Fall mit 5 zu multiplizieren. Auf die Uricaseverdauung mußte jedoch wegen der hohen Harnsäurekonzentration im Urin verzichtet werden.

5.5 Recoveryversuche

Bei zehn Versuchen mit bekannten Oxipurinolkonzentrationen konnten 61 - 67 % der eingesetzten Mengen nachgewiesen werden; ca. 35 % gingen also insgesamt bei den verschiedenen Arbeitsgängen verloren. Die Oxipurinolkonzentrationen im Serum und Urin müßten bei absoluter Konzentrationsangabe mit 1,56 multipliziert werden. Auf einen internen Standard (z.B. radioaktiv markiertes Oxipurinol) wurde verzichtet, da es sich um vergleichende Untersuchungen handelte. Aus dem gleichen Grunde sind die gemessenen Oxipurinolkonzentrationen nicht mit dem Faktor multipliziert worden.

III. Ergebnisse

1. Verhalten der Serum-Harnsäure

Versuch a:

Gabe von 300 mg Allopurinol in drei Einzeldosen von 100 mg jeweils um 9^h, 14^h und 19^h.

Bei Proband A war der Harnsäurespiegel im Serum von 5,4 mg% vor der Behandlung nach vier Tagen auf durchschnittlich 2,5 mg% gesunken, bei Proband B, ebenfalls nach vier Tagen, von 3,3 mg% auf 1,5 mg%. Nach 14 Tagen lagen die Werte im gleichen Bereich. Während des Tages fielen die Harnsäure-Werte bis zu 1 mg% ab, in der folgenden Nacht stiegen sie wieder an; nach etwa fünf Tagen blieben die gemessenen Tagesprofile in ihrer Höhe ungefähr konstant.

(Abb. 9, 10, gestrichelte Linien)

(Tab. 1)

T a b e l l e 1

Harnsäure in mg% bei Gabe von 3x100 mg Allopurinol/die

Proband A

Tag	HS in mg%			Differenz der 9 ^h -Werte von 2 aufeinander- folgenden Tagen	Differenz zw. den Tagesmax.- und -minimal- Werten	Anstieg während der Nacht
	9 ^h	14 ^h	19 ^h			
I	5,40	5,4	4,85	-	- 0,55	-
II	4,25	3,9	3,2	- 1,15	- 1,05	- 0,6
III	3,4	2,6	2,55	- 0,85	- 0,85	+ 0,2
IV	2,75	2,35	1,7	- 0,65	- 1,05	+ 0,2
V	1,3	2,3	2,7	- 1,45	+ 1,4	- 0,4
VI	2,6	1,95	2,5	+ 1,3	- 0,1	- 0,1
XIII	2,7	2,6	2,4	-	- 0,3	-
XIV	2,8	-	-	+ 0,1	-	+ 0,4

Proband B

I	3,3	3,2	2,8	-	- 0,5	-
II	2,8	2,45	2,35	- 0,5	- 0,45	0
III	2,65	2,0	1,9	- 0,15	- 0,75	+ 0,3
IV	2,25	1,3	1,15	- 0,4	- 1,1	+ 0,35
V	2,55	2,2	1,85	+ 0,3	- 0,7	+ 1,4
VI	1,8	1,3	1,2	- 0,75	- 0,6	- 0,05
XIII	1,7	1,3	1,2	-	- 0,5	-
XIV	1,35	-	-	- 0,35	-	+ 0,15

Versuch b:

Gabe einer Einzeldosis von 300 mg Allopurinol um 9^h

Nach Gabe einer einmaligen morgendlichen Dosis von 300 mg Allopurinol fiel bei Proband A der Harnsäurespiegel in den ersten vier Tagen von 5,1 mg% auf durchschnittlich 2,8 mg%, bei Proband B im gleichen Zeitraum von 4 mg% auf 2 mg%. 14 Tage später wurden die Serumharnsäurespiegel in gleicher Höhe bestimmt. Der Abfall der Harnsäurewerte während des Tages betrug bis zu 1 mg%, nach fünf Tagen pendelten sich die Tagesschwankungen bei beiden Untersuchungspersonen auf etwa 0,5 mg% ein.

(Abb. 9, 10, durchgezogene Linien)

(Tab. 2)

T a b e l l e 2

Harnsäure in mg% bei einmaliger Gabe von 300 mg Allopurinol/die

Proband A

Tag	HS in mg%		19 ^h	Differenz der 9 ^h -Werte von 2 aufeinander- folgenden Tagen	Differenz zw. den Tagesmax.- und -minimal- Werten	Anstieg während der Nacht
	9 ^h	14 ^h				
I	5,1	5,05	4,1	-	- 1,0	-
II	4,4	4,2	3,35	- 0,7	- 1,05	+ 0,3
III	3,7	2,95	2,75	- 0,7	- 0,95	+ 0,35
IV	3,35	2,9	2,65	- 0,35	- 0,7	+ 0,6
V	3,2	3,1	2,9	- 0,15	- 0,3	+ 0,55
VI	2,6	2,8	2,4	- 0,6	- 0,4	- 0,3
XIII	2,9	2,75	2,6	-	- 0,3	-
XIV	3,2	-	-	+ 0,3	-	+ 0,6

Proband B

I	4,0	4,0	3,5	-	- 0,5	-
II	4,0	3,25	2,85	0	- 1,15	+ 0,5
III	3,05	2,8	2,15	- 0,95	- 0,90	+ 0,2
IV	2,55	2,2	2,05	- 0,5	- 0,5	+ 0,4
V	2,4	2,0	1,85	- 0,15	- 0,55	+ 0,35
VI	2,5	2,1	1,5	+ 0,1	- 1,0	+ 0,65
XIII	2,1	1,9	1,5	-	- 0,6	-
XIV	1,8	-	-	- 0,3	-	+ 0,3

2. Verhalten der Oxipurinolspiegel im Serum

Versuch a:

Gabe von 300 mg Allopurinol in drei Einzeldosen von 100 mg jeweils um 9^h, 14^h und 19^h.

Beide Probanden erreichten meist mittags die höchsten Serumoxipurinolkonzentrationen, die niedrigsten Werte hatten sie am Morgen. Die Tageshöchstwerte stiegen in den ersten fünf Tagen bei Proband A von 0 auf ca. 0,9 mg%, bei Proband B von 0 auf 1 mg% an, die Tagesminimalwerte erreichten im gleichen Zeitraum 0,6 mg% (Proband A) bzw. 0,77 mg% (Proband B). Danach blieben diese Werte bis zum Einnahmeende ziemlich konstant, die Schwankungen zwischen den minimalen und maximalen Serumoxipurinolkonzentrationen des Tages lagen bei 0,2 - 0,3 mg%. Zwei Tage nach der Einnahmeperiode wurden bei Proband B noch 56 % der Oxipurinolkonzentration des Vortages nachgewiesen.

(Abb. 11, 12, gestrichelte Linien)

(Tab. 3)

T a b e l l e 3

Oxipurinol in mg% bei Gabe von 3x100 mg Allopurinol/die

Proband A

Tag	Oxip. in mg%			Differenz der 9 ^h -Werte von 2 aufeinander- folgenden Tagen	Differenz zw. den Tagesmax.- und -minimal- Werten	Abfall während der Nacht
	9 ^h	14 ^h	19 ^h			
I	0	0,25	0,37	-	+ 0,37	-
II	0,37	0,62	0,48	+ 0,37	+ 0,25	0
III	0,55	0,68	0,75	+ 0,18	+ 0,2	+ 0,07
IV	0,57	0,97	0,8	+ 0,02	+ 0,4	- 0,18
V	0,6	0,86	0,77	+ 0,03	+ 0,26	- 0,2
VI	0,73	0,91	0,78	+ 0,13	+ 0,18	- 0,04
XIII	0,65	0,9	0,81	- 0,08	+ 0,25	- 0,13
XIV	0,53	-	-	- 0,12	-	- 0,28

Proband B

I	0	0,28	0,48	-	+ 0,48	-
II	0,35	0,62	0,6	+ 0,35	+ 0,27	- 0,13
III	0,52	0,71	0,72	+ 0,17	+ 0,2	- 0,08
IV	0,72	0,85	0,81	+ 0,2	+ 0,13	0
V	0,84	0,96	0,8	+ 0,12	- 0,16	+ 0,03
VI	0,77	0,97	0,8	- 0,07	+ 0,2	- 0,03
XIII	0,77	0,99	0,91	-	+ 0,22	-
XIV	0,78	-	-	+ 0,01	-	- 0,13
XV	0,45	-	-	- 0,33	-	-

Versuch b:

Gabe einer Einzeldosis von 300 mg Allopurinol um 9^h

Die niedrigsten Oxipurinolkonzentrationen hatten beide Untersuchungspersonen stets am Morgen, die höchsten Werte in der Regel mittags (bei Proband B erst nach vier Tagen). Die Tagesmaximalwerte erreichten bei Proband A und B nach fünf Tagen eine Höhe von 0,9 bzw. 1,1 mg%, die Minimalwerte im gleichen Zeitraum 0,65 - 0,7 mg%; am letzten Tag der Einnahmeperiode wurden dieselben Konzentrationen gemessen. Die Differenzen zwischen den Tagesmaximal- und -minimalwerten waren bei Proband A 0,2 - 0,3 mg%, bei Proband B betrugen sie 0,4 - 0,65 mg%. Am 15. Tag des Versuches war bei Proband B der Oxipurinolspiegel um 21 % abgefallen. (Abb. 11, 12, durchgezogene Linien)
(Tab. 4)

T a b e l l e 4

Oxipurinol in mg% bei Gabe von 1x300 mg Allopurinol/die

Proband A

Tag	Oxip. in mg%			Differenz der 9 ^h -Werte von 2 aufeinander- folgenden Tagen	Differenz zw. den Tagesmax.- und -minimal- Werten	Abfall während der Nacht
	9 ^h	14 ^h	19 ^h			
I	0	0,56	0,47	-	+ 0,56	-
II	0,37	0,69	0,59	+ 0,37	+ 0,32	- 0,1
III	0,55	0,8	0,76	+ 0,18	+ 0,25	- 0,04
IV	0,57	0,83	0,93	+ 0,02	+ 0,36	- 0,19
V	0,91	1,02	0,94	+ 0,34	+ 0,11	- 0,02
VI	0,65	0,89	0,8	- 0,26	+ 0,24	- 0,29
XIII	0,62	0,85	0,83	-	+ 0,23	-
XIV	0,68	-	-	+ 0,06	-	- 0,15

Proband B

I	0	0,45	0,51	-	+ 0,51	-
II	0,45	0,62	0,69	+ 0,45	+ 0,24	- 0,06
III	0,43	0,78	0,88	- 0,02	+ 0,45	- 0,26
IV	0,76	0,91	0,97	+ 0,33	+ 0,21	- 0,12
V	0,65	1,12	1,0	- 0,11	+ 0,47	- 0,32
VI	0,58	1,02	0,95	- 0,07	+ 0,44	- 0,42
XIII	0,7	1,08	1,04	-	+ 0,38	-
XIV	0,72	-	-	+ 0,02	-	- 0,32
XV	0,55	-	-	- 0,17	-	-

3. Oxipurinoltagesausscheidung im Urin nach Gabe von
3x100 mg Allopurinol pro Tag

Die Oxipurinoltagesausscheidung der Probanden steigen in beiden Dosierungen parallel an, nach sechs Tagen werden etwa 300 mg erreicht. Am zweiten Tag nach der letzten Einnahme sind noch ca. 55 % der Menge des Vortages nachzuweisen.

(Abb. 13 und 14)

(Tab. 5)

T a b e l l e 5

Oxipurinoltagesausscheidung im Urin in mg

Proband A

Tag	3x100 mg Allopurinol/die	1x300 mg Allopurinol/die
I	210	198
II	225	238
III	268	258
IV	247	284
V	290	302
VI	305	319
XIII	272	280
XIV	153	145

Proband B

I	179	196
II	208	213
III	227	237
IV	259	263
V	300	291
VI	315	310
XIII	280	275
XIV	146	162

4. Verhalten der Harnsäure- und Oxipurinolspiegel im Serum von Patienten mit Hyperuricämie nach Gabe einer Einzeldosis von 300 mg Allopurinol täglich.

- 4.1 Die Serumharnsäurekonzentrationen der zehn Patienten lagen vor Behandlungsbeginn zwischen 7,0 und 10,5 mg%. Nach sechs Tagen Behandlung mit einer morgendlichen Dosis von 300 mg Allopurinol sanken die Harnsäurespiegel um 2 - 5 mg% ab, bei höheren Ausgangswerten zeigte sich ein stärkerer Abfall. Der Morgenwert war stets höher als der Abendwert des Vortages, die Differenz der beiden Werte betrug bis zu 0,8 mg%. (Tab. 6)

T a b e l l e 6

Versuchsprotokoll eines der zehn Patienten

Harnsäure in mg%

		morgens	abends
Vorbehandlung	1. Tag	8,69	-
	2. Tag	8,45	-
Therapie	1. Tag	8,76	7,16
	2. Tag	7,5	-
	3. Tag	7,03	5,76
	4. Tag	6,5	5,66
	5. Tag	6,51	5,5
	6. Tag	6,15	5,31
Nachbehandlung	1. Tag	5,97	6,62
	2. Tag	6,98	-

- 4.2 Da zur Oxipurinolbestimmung nicht genügend Serum für Einzelbestimmungen zur Verfügung stand, wurde von jedem der Patientenseren 1 ml genommen und die Oxipurinolkonzentration der gepoolten Seren bestimmt.

Der Verlauf der Serumoxipurinolspiegel der Patienten mit Hyperuricämie gleicht dem der gesunden Probanden. Die Tageshöchstwerte lagen (bei zwei Blutentnahmen pro Tag) immer abends, nach fünf Behandlungstagen wurde ein Serumspiegel von 0,99 mg% erreicht; die Tagesschwankungen betrugen maximal 0,42 mg%. Am zweiten Tag nach Abschluß der Therapie war der Oxipurinolspiegel um 35 % abgefallen.

(Abb. 15)

(Tab. 7)

T a b e l l e 7

Oxipurinol in mg% bei Gabe von 1x300 mg Allopurinol/die

Tag	Oxip. in mg%		Differenz der 9 ^h -Werte von 2 aufeinander- folgenden Tagen	Differenz zw. den Tagesmax- und -minimal- Werten	Abfall während der Nacht
	morgens	abends			
I	0	0,47	-	+ 0,47	-
II	0,5	0,55	+ 0,50	+ 0,05	+ 0,03
III	0,44	0,67	- 0,06	+ 0,23	- 0,11
IV	0,7	0,8	+ 0,26	+ 0,1	+ 0,03
V	0,56	0,99	- 0,14	+ 0,43	- 0,24
VI	0,53	0,94	- 0,03	+ 0,41	- 0,46
VII	0,63	-	+ 0,1	-	- 0,31
VIII	0,4	-	- 0,23	-	-

IV. Diskussion

1. Allopurinol ist neben den urikosurisch wirkenden Pharmazeutica das wichtigste Medikament zur Behandlung der Hyperuricämie. Die Aufgabenstellung der vorliegenden Untersuchung war es, einen Vergleich zwischen der Wirkung der bisher meist gegebenen 3x100 mg Tagesdosis und der neu eingeführten 300 mg Einmaldosis von Allopurinol an gesunden Probanden und, soweit möglich, an Gichtpatienten durchzuführen.

Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Bestimmung der Oxipurinolkonzentrationen im Serum und im Urin bei beiden Verabreichungsformen, da Oxipurinol, das ebenfalls die Xanthinoxidase hemmt, als der wichtigste Metabolit von Allopurinol wegen seiner längeren Halbwertszeit die Gabe einer Einmaldosis erst sinnvoll erscheinen läßt.

2. Methodik

Bei den Vorversuchen zur Bestimmung der Serum- und Oxipurinolkonzentrationen wurde die von Elion et al. (1 b, 4) entwickelte Methode in verschiedenen Punkten geändert.

- 2.1 Auf der zur Trennung der Purine und Purinanalogen vom Serumweiß benützten Bio-Gel-P 2-Säule konnte unter den gewählten Bedingungen (Molarität, pH) des zur Elution genommenen Puffers eine weitgehende Vorfraktionierung erreicht werden. Als weiterer Vorteil erwies sich das Abdauen der Serumharnsäure mit Uricase zu Allantoin. Allantoin zeigt bei der photometrischen

Registrierung (Wellenlänge 252 nm) der Absorption des Eluats nahezu keine Extinktion. Dadurch werden die Fraktionen sichtbar, die sonst vom Harnsäurepeak verdeckt sind. Der Oxipurinolpeak erscheint bei der Elution als letzter, er kann näherungsweise als Maß für die Oxipurinolkonzentration genommen werden.

- 2.2 Bei der folgenden Konzentrierung der eluierten Substanzen an einem Dowex-1X8-Ionenaustauscher in der Formiatform wird Oxipurinol quantitativ an die Säule gebunden. Das Harnsäureabbauprodukt Allantoin - als die größte Fraktion - wird nicht adsorbiert. Dadurch wird die Auftragsmenge für die weitere dünnsschichtchromatographische Fraktionierung reduziert und eine bessere Trennung der einzelnen Substanzen erreicht.
- 2.3 Geändert wurde auch die Auftrennung der Purine und der Purinanaloge Allopurinol und Oxipurinol auf Dünnsschichtplatten. Durch Bedampfen der Kieselgelplatten mit Ammoniakdampf (siehe Teil Methodik) konnte mit einem sauren Laufmittelgemisch eine vollständige Trennung aller Substanzen erzielt werden. Durch den Säureanteil des Laufmittelgemisches wird der RF-Wert der Oxipurinolbande bestimmt. Die Trennung erfolgt wahrscheinlich durch pH-Änderungen auf der Kieselgelplatte.
- 2.4 Für die klinische Routine ist diese Methode der Oxipurinolbestimmung zu aufwendig, man benötigt außerdem sehr viel Serum. Will man jedoch einen raschen Überblick gewinnen, z.B. ob ein Patient seine Tabletten nimmt, kann aus der photometrischen Registrierung des Eluats der Bio-Gel-Säule approximativ die Oxipurinol-

konzentration bestimmt werden. Steht zur Bestimmung nur wenig Serum zur Verfügung, ist die Isotopendilutionsmethode nach Elion (1 b, 4) vorzuziehen, von Nachteil ist jedoch das Arbeiten mit radioaktiven Substanzen über viele Zwischenschritte. Neuere Methoden zur Bestimmung von Allopurinol und Oxipurinol im Serum mit Hochdruckflüssigkeitschromatographen (16,17) werden meist am großen apparativen Aufwand scheitern.

3. Ergebnisse

3.1 Harnsäure

Was den Gesamtabfall der Serumharnsäurespiegel über den jeweiligen Versuchszeitraum betrifft, konnte bei beiden Probanden kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten bei dreimaliger Dosierung und denen bei einmaliger Gabe der Gesamtdosis festgestellt werden. Auch bei den zehn Patienten mit einer Hyperuricämie, die mit der Einmaldosis behandelt wurden, lag der Harnsäureabfall im Beobachtungszeitraum in dem von der üblichen Behandlung her bekannten Rahmen.

Bei den Tagesschwankungen ergaben sich ebenfalls keine Unterschiede. Die Harnsäurespitzen lagen bei beiden Versuchen in der Regel am Morgen, bei Gabe von 1x300 mg Allopurinol durchschnittlich geringfügig höher als bei 3x100 mg. Die Differenz vom höchsten zum niedrigsten Tageswert war jedoch bei einmaliger Medikation von 300 mg Allopurinol nicht größer als bei drei Tabletten über den Tag verteilt.

Es treten also auch bei der Einzeldosierung keine stärkeren Harnsäure-Spitzen auf, die z.B. zu Gichtanfällen führen könnten.

3.2 Oxipurinol

Vergleicht man die Kurven der Serumoxipurinolkonzentrationen beider Probanden nach Einmal- und Dreifach-Dosierung von 300 mg Allopurinol täglich, so steigen die Tagesmaximalwerte in fünf Tagen auf etwa die gleiche Höhe an. Bei beiden Versuchen waren die Morgenwerte stets die niedrigsten, die höchsten Oxipurinolkonzentrationen wurden erstaunlicherweise auch bei der aufgeteilten Dosierung meist mittags gemessen. Die Tagesschwankungen der Oxipurinolkonzentrationen (Differenz zwischen Maximal- und Minimalwert) scheinen zumindest bei Proband B bei der Einmaldosierung etwas höher zu sein.

Die Oxipurinoltagesausscheidung im Urin zeigt bei beiden Dosierungen keinen Unterschied.

Die Kurve der Oxipurinolkonzentrationen der gepoolten Seren der Gichtpatienten, die 1x300 mg Allopurinol täglich erhielten, unterscheidet sich (bei zwei Blutentnahmen täglich) nicht wesentlich von den entsprechenden Kurven der gesunden Probanden.

- 3.3. Wenn man nun die jeweiligen Oxipurinolspiegel mit den zugehörigen Harnsäurewerten vergleicht, zeigt sich, daß die nur geringfügig größeren Tagesschwankungen der Oxipurinolspiegel bei der Einmaldosierung keinen erkennbaren Einfluß auf die entsprechenden Harnsäurewerte hatten. Die Oxipurinolspiegel am Morgen, also die Minimalwerte, reichten in jedem Falle aus, Harnsäurespitzen zu vermeiden; die Tagesschwankungen der Harnsäurewerte erreichten maximal 1 mg%.

Eine ähnlich vergleichende Kurzzeitstudie zur Einfach- und Mehrfachtagesdosierung von Allopurinol, jedoch ohne Berücksichtigung der Tagesschwankungen, wurde von Rodnan et al. (17) durchgeführt. Die Autoren kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, daß beide Dosierungen therapeutisch ähnlich gut wirksam zu sein scheinen. Als Konsequenz ist die tägliche Einmalgabe vorzuziehen, da sie die einfachere und damit zuverlässigere Behandlung darstellt. Eine endgültige Entscheidung kann jedoch erst eine breit angelegte Langzeitstudie bringen.

V. Zusammenfassung

Der im Körper aus Allopurinol entstehende Hauptmetabolit Oxipurinol ist für den therapeutischen Effekt von Allopurinol zum größten Teil verantwortlich zu machen. Er hat eine etwa zehnmal längere Halbwertszeit. Mit Bekanntwerden dieser Tatsachen wurde in der klinischen Praxis begonnen, die Tagesdosis von Allopurinol statt auf mehrere Einzeldosen verteilt in einer Einzeldosis auf einmal zu geben. Die Harnsäurewerte der Patienten rechtfertigten dieses Vorgehen. Wir versuchten, durch Bestimmung des Oxipurinols den direkten Zusammenhang zwischen Oxipurinolspiegel und Harnsäurewerten zu erhellen und die Berechtigung der Behandlung mit einer Einzeldosis Allopurinol täglich zu beweisen. Dazu wurde die Methode von Elion modifiziert und weiterentwickelt. Serum bzw. Urin werden säulenchromatographisch vorgetrennt, aus den isolierten Purinen mit Hilfe einer Dünnschichtchromatographie Oxipurinol weiter isoliert und photometrisch bestimmt. Diese Methode ist aufwendig und eignet sich nicht für die klinische Routine. Es wurden die Oxipurinol- und Harnsäurespiegel im Serum bei bisher üblicher Verteilung der Dosis mit denen bei einmaliger morgendlicher Gabe der Dosis verglichen. Wir konnten dabei keine signifikanten Unterschiede im Verhalten der Serumoxipurinolspiegel (Minimalwerte, Tagesschwankungen), der Oxipurinolausscheidungen im Urin und der Harnsäurewerte bei beiden Versuchen nachweisen. Auch der Vergleich zwischen den Serumoxipurinolspiegeln nach Gabe einer täglichen Einzeldosis von 300 mg Allopurinol bei gesunden Probanden und bei Hyperuricämiepatienten zeigte keine wesentlichen Unterschiede.

Bei gleicher Wirksamkeit der beiden Dosierungen ist als Ergebnis dieser Kurzzeitstudie die tägliche Einmaldosis als die einfachere und zuverlässigere Behandlung der Mehrfachverabreichung vorzuziehen. Eine endgültige Entscheidung darüber kann jedoch nur eine Langzeitstudie erbringen.

VI. Abbildungen

Abb. 1 (oben) Absorptions-Spektren von Allopurinol
quantitativ (einfache und doppelte Menge)

Abb. 2 (unten) Absorptions-Spektren von Oxipurinol
(einfache, doppelte und vierfache Menge)

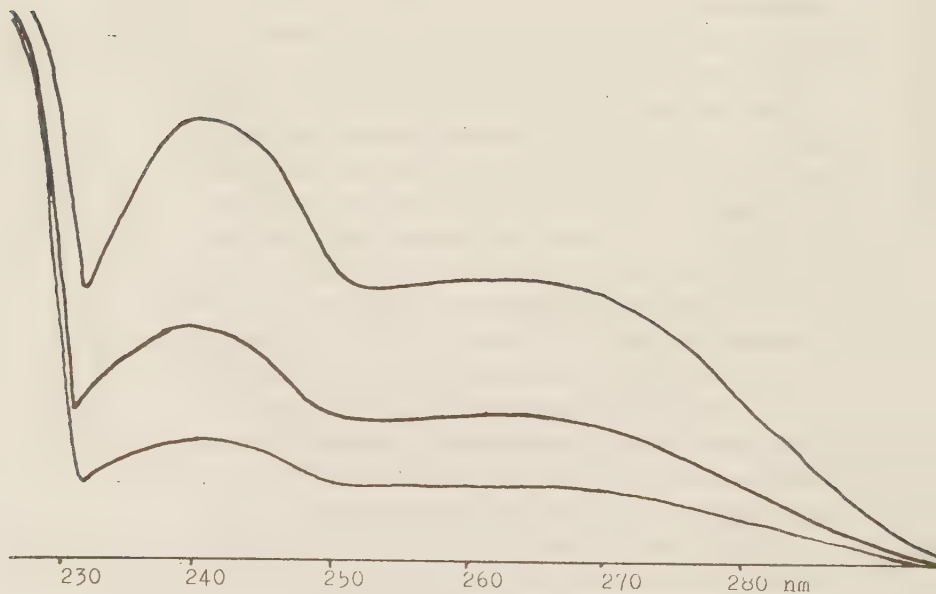
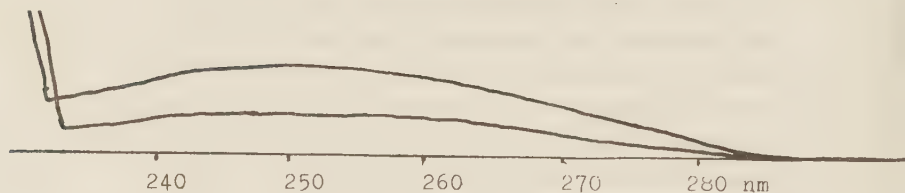


Abb. 3 Absorptions-Spektren von allopurinol (unten),
Oxipurinol (Mitte) und Gemisch (oben)
(gleiche Mengen)



Abb.4 Eichkurve der Oxipurinol-Konzentrationen:
Oxipurinol-Verdünnungsreihe in 10 ml SÖRENSEN-
Glycin-Puffer, Leerwert mit dem gleichen Puffer

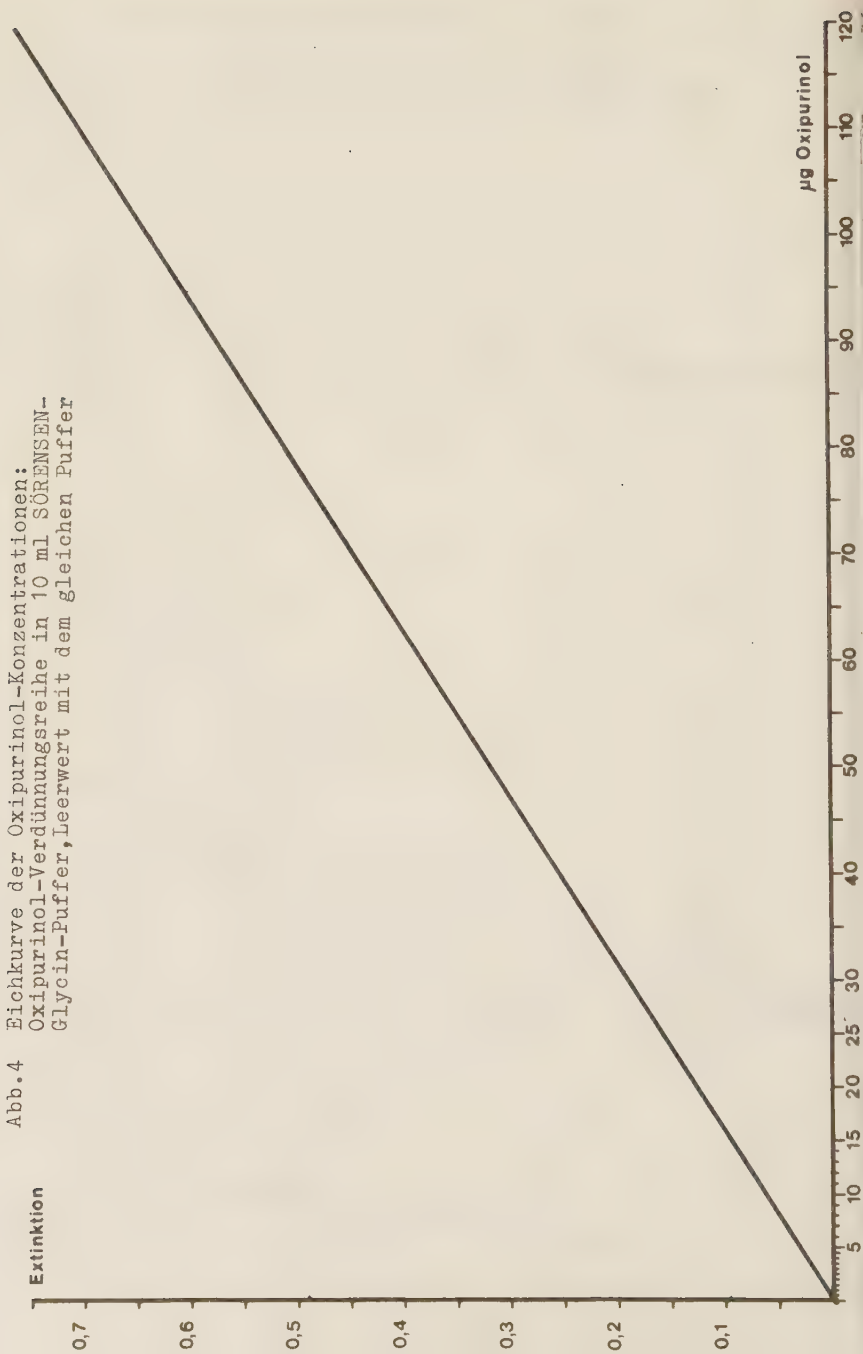


Abb.5 Elutionskurve der Biogelsäule mit
Oxipurinol-Standard in Phosphatpuffer
(10 ml Serum, 0,15mg Oxipurinol, Harn-
säure mit Uricase zu Allantoin umgewandelt)

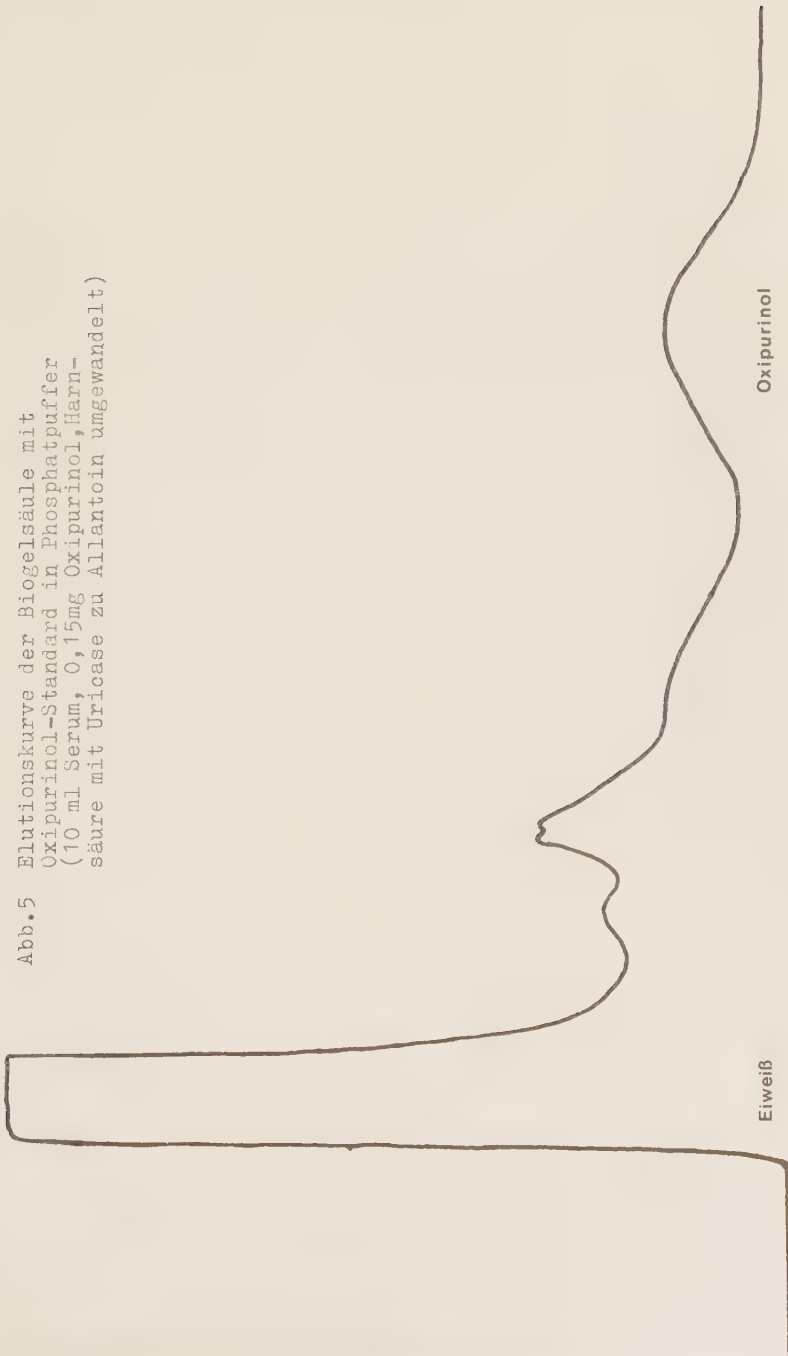


Abb. 6 Elutionskurve des Serums auf der Biogel-
und auf der Dowex-Säule am 1. Tag abends
(Proband B; 0,048mg Oxipurinol)
Das Eluat jeweils zwischen den senkrechten
Linien wurde aufgefangen

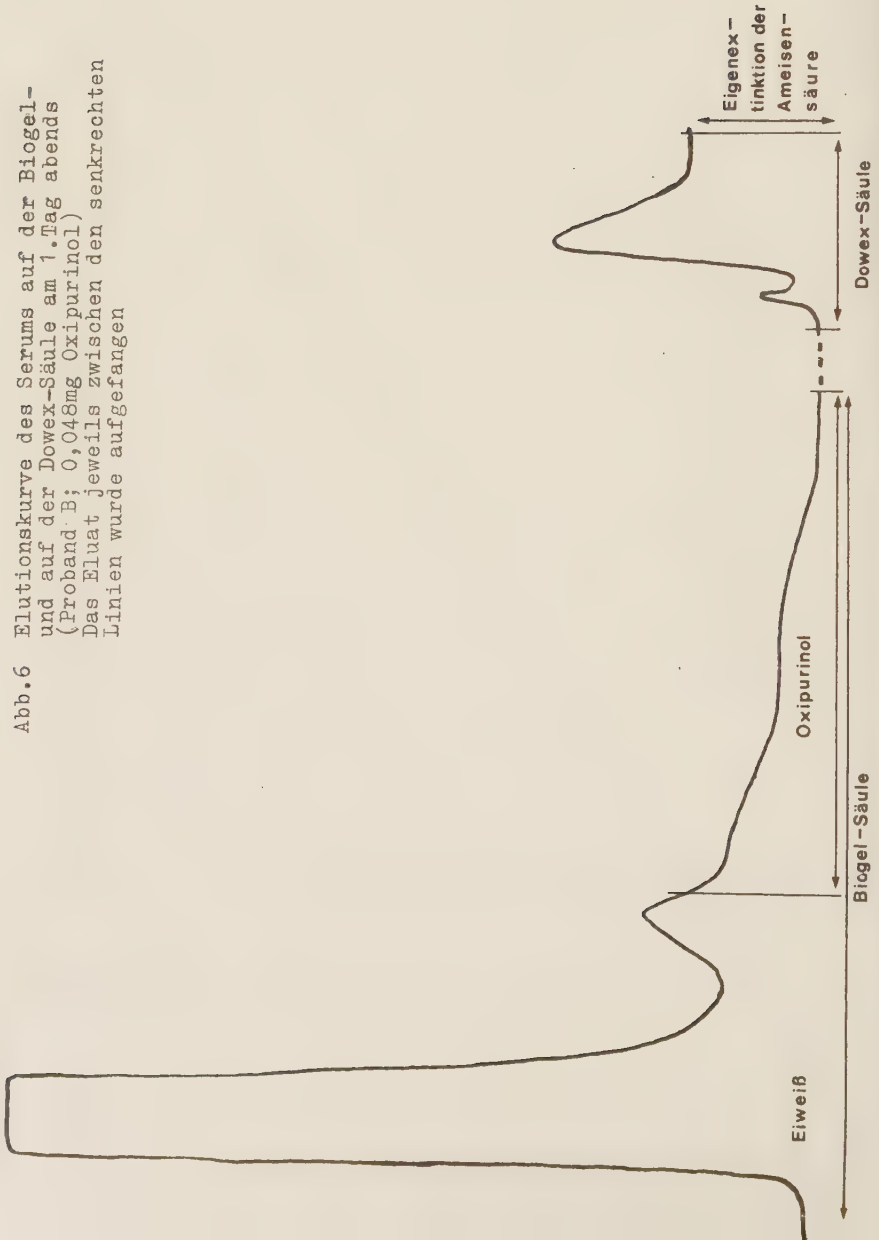
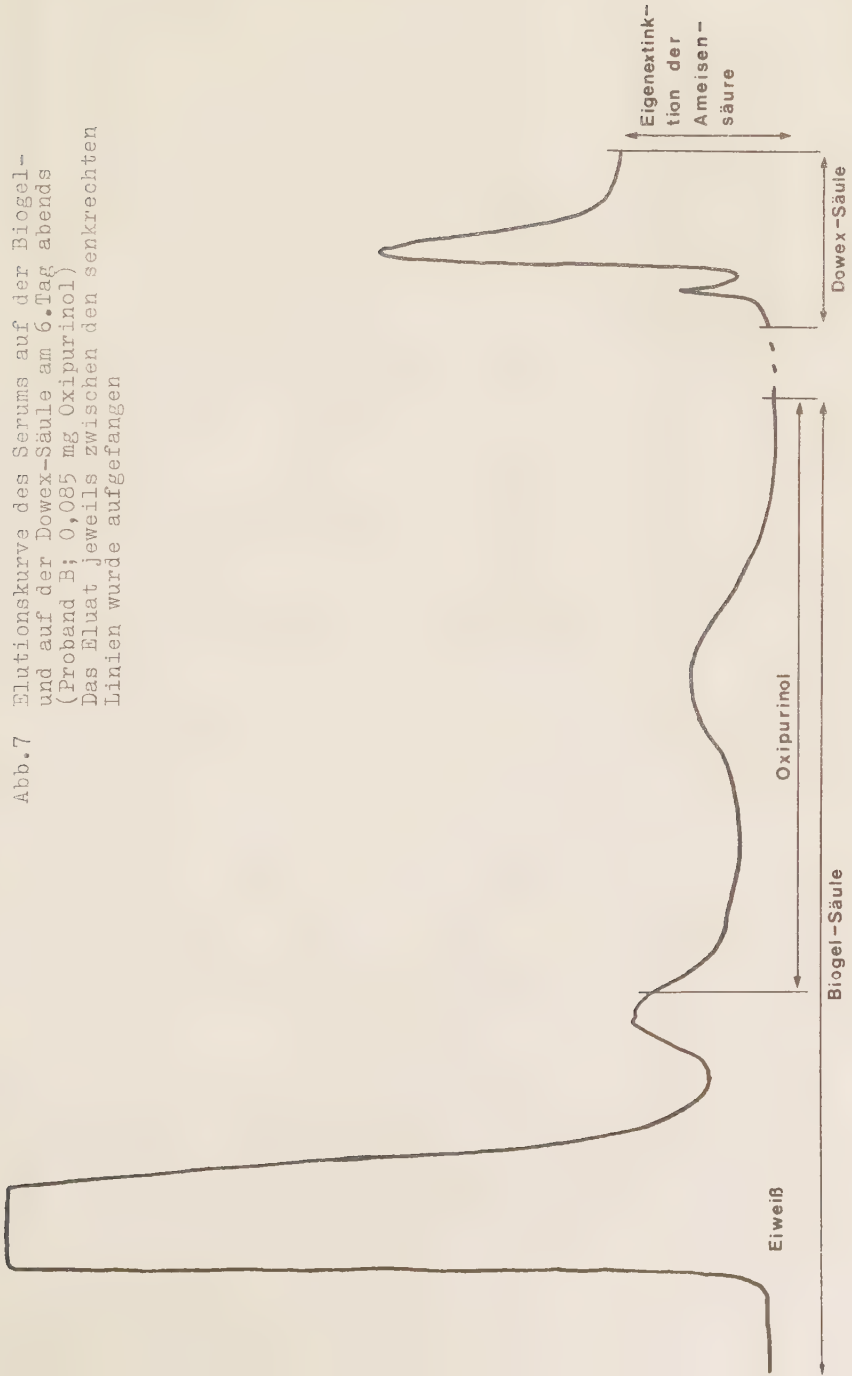


Abb.7 Elutionskurve des Serums auf der Biogel-
und auf der Dowex-Säule am 6.Tag abends
(Proband B; 0,085 mg Oxipurinol)
Das Eluat jeweils zwischen den senkrechten
Linien wurde aufgefangen



Trennung des Serum-
weisses von den Purinen
u. Purinanalogen auf der
Biogel-Säule mit Glycin-
puffer (statt Phosphat-
puffer), 10mmol, pH 9,0

Abb. 8

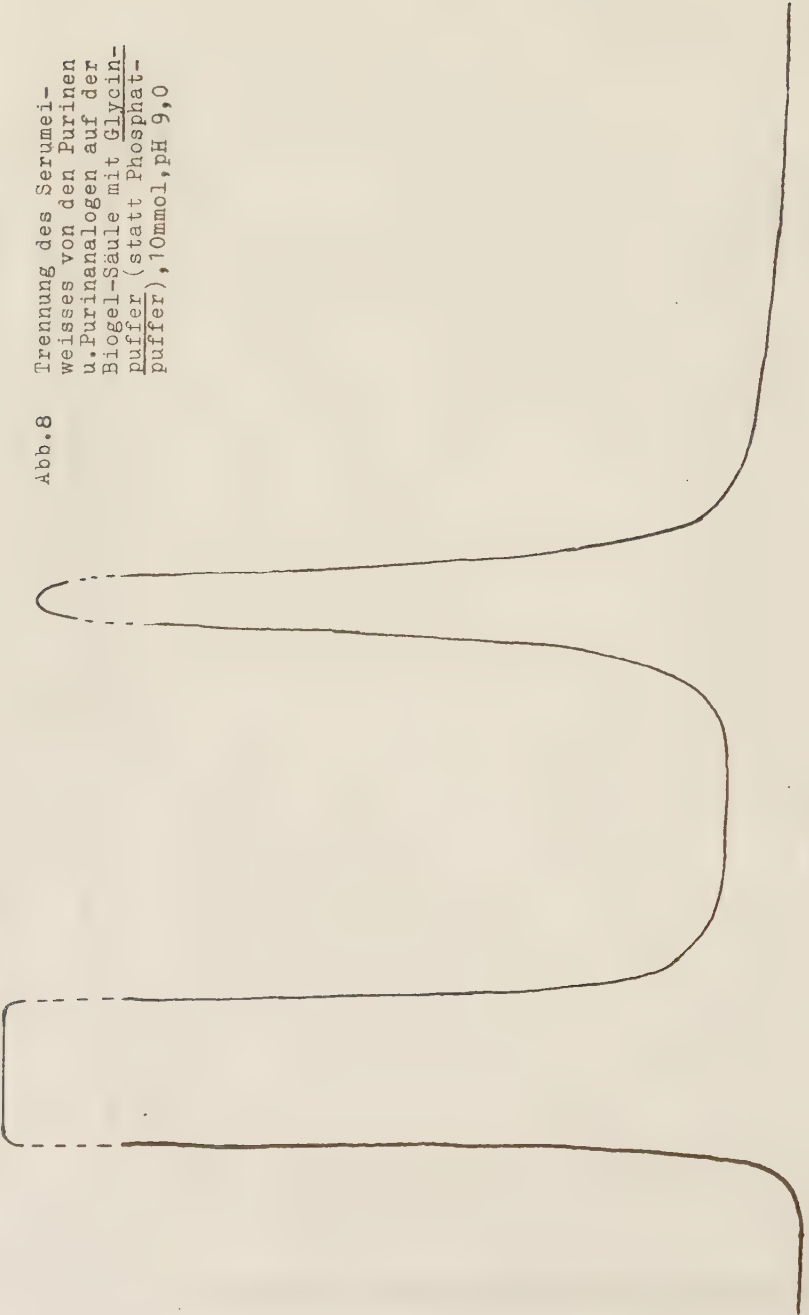


Abb.9 Tagesprofil der Harnsäure-Spiegel
im Serum des Probanden A
bei Einnahme von
- - - 3 x 100 mg Allopurinol
- - - 1 x 300 mg Allopurinol



Abb.10 Tagesprofil der Harnsäure-Spiegel
im Serum des Probanden B
bei Einnahme von
- - - 3 x 100 mg Allopurinol
— 1 x 300 mg Allopurinol



Abb. 11 Tagesprofil der Oxipurinol-Spiegel
im Serum des Probanden A
bei Einnahme von
- - - 3 x 100 mg Allopurinol
— 1 x 300 mg Allopurinol

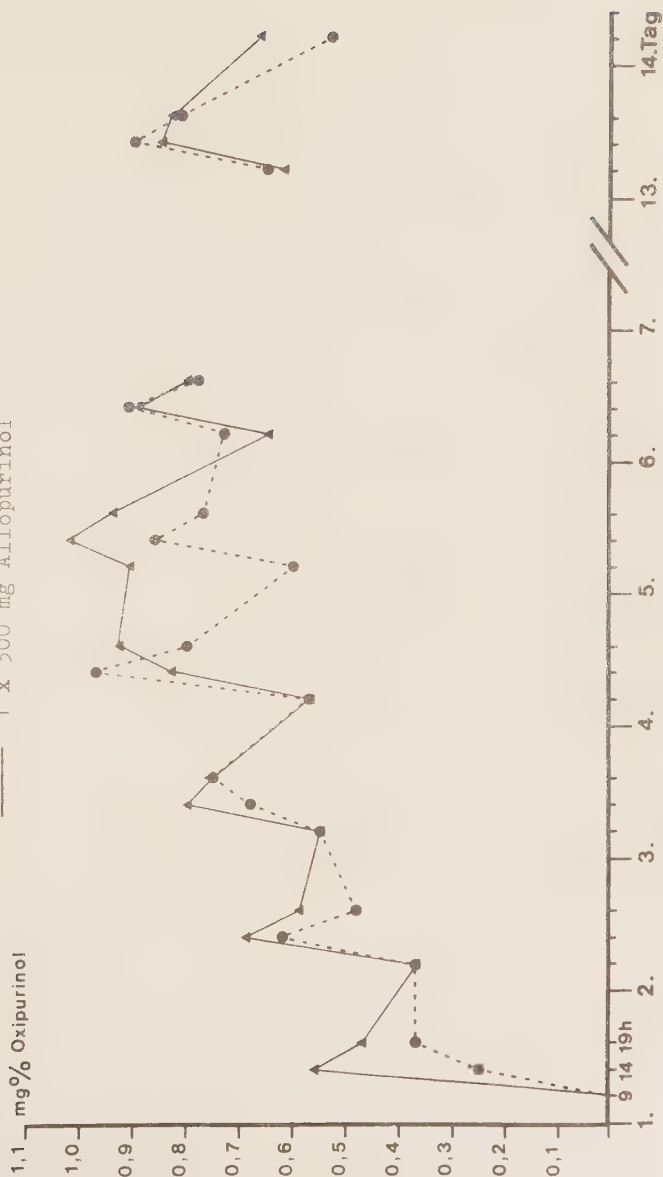
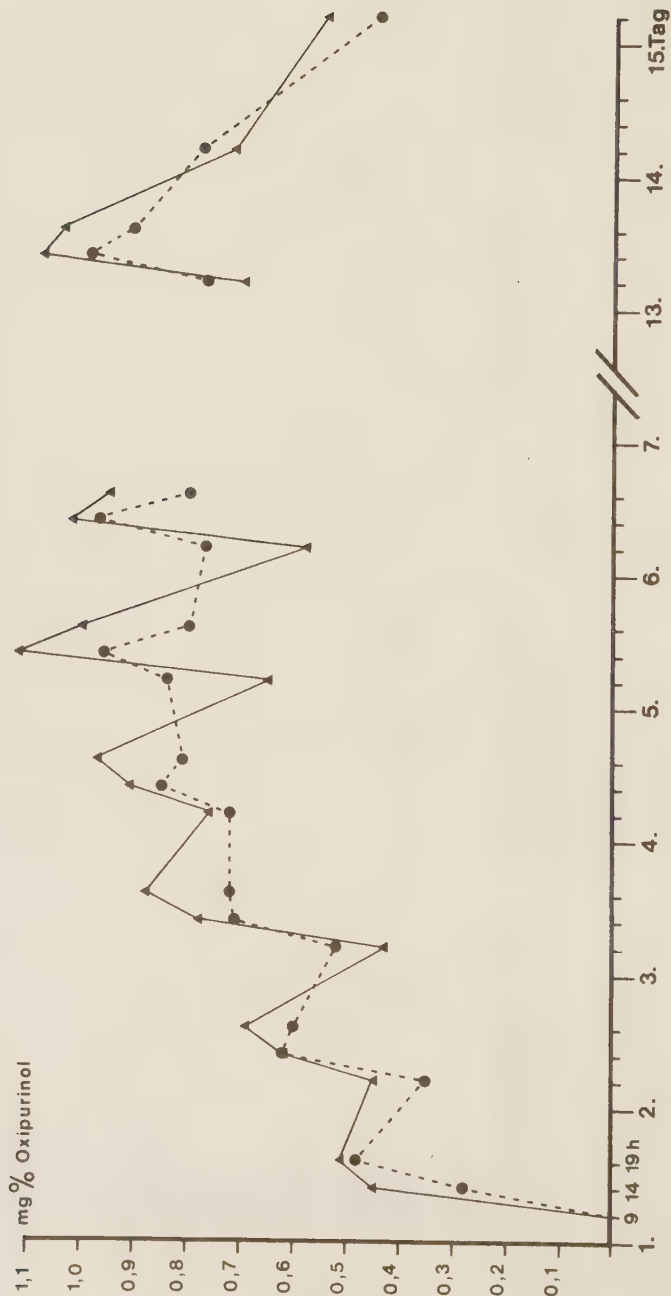


Abb. 12 Tagesprofil der Oxipurinol-Spiegel
im Serum des Probanden B
bei Einnahme von
- - - 3 x 100 mg Allopurinol
— 1 x 300 mg Allopurinol



Oxipurinol-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin

Abb.13 des Probanden A

Abb.14 des Probanden B

bei Einnahme von
- - - 3 x 100 mg
— 1 x 300 mg allopurinol

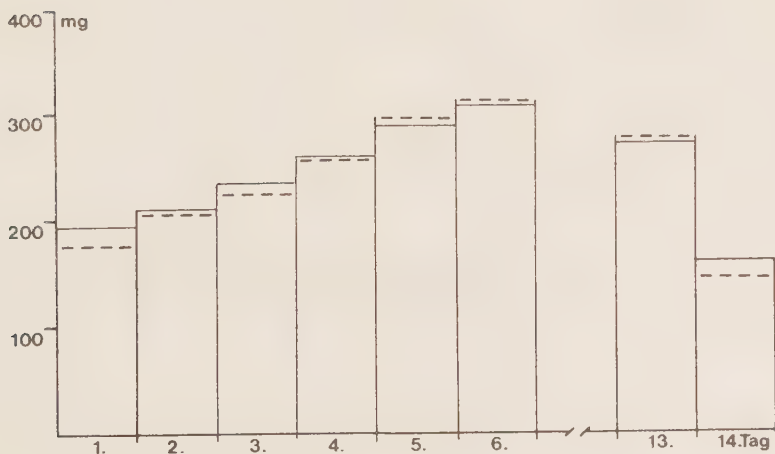
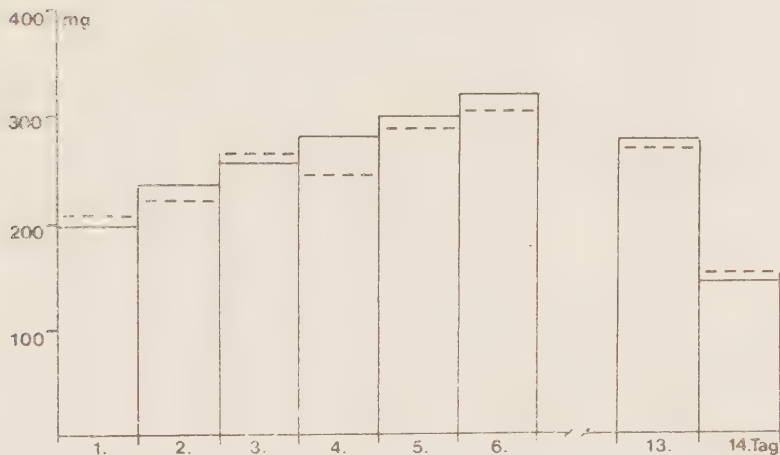
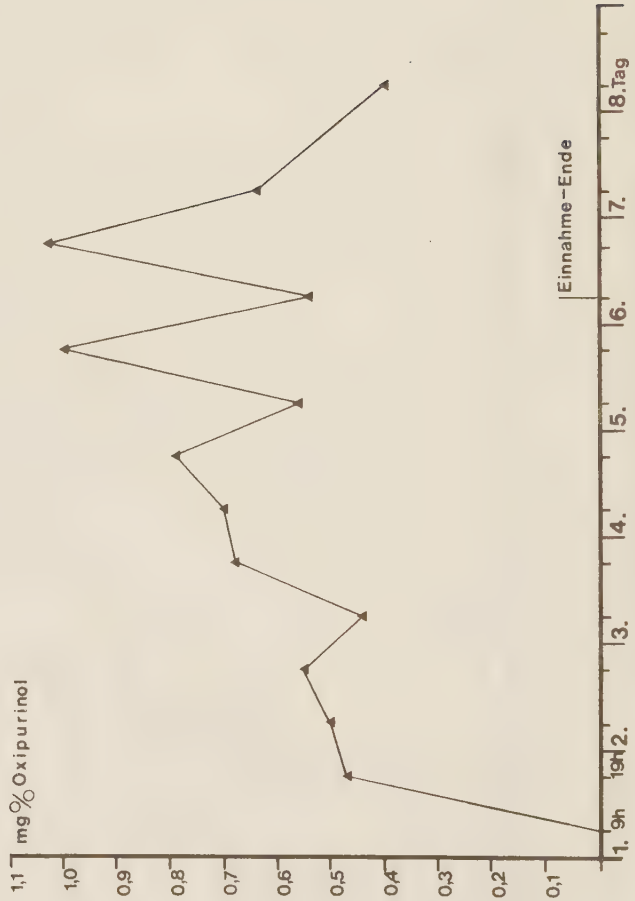


Abb. 15 Kurve der Oxipurinol-Konzentrationen von 10 Patienten mit Hyperuricämie, die über 6 Tage mit einer Einzeldosis von 300 mg Allopurinol behandelt wurden. Die Patienten sind gepoolt.



VII. Literaturverzeichnis

1. a Elion G. B.:
Enzymatic and metabolic studies with allopurinol.
Ann. Rheum. Dis. 25,608-614 (1966)
- b Elion G.B., Kovensky A., Hitchings G.H., Metz E.,
Rundles R.W.:
Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of
xanthine oxidase.
Biochem. Pharmacol. 15,863-880 (1966)
- 2 Krenitzky T.A., Elion G.B., Strelitz R.A., Hitchings G.H.:
Ribonucleosides of allopurinol and oxallopurinol.
Biol. Chem. 242,2675-2682 (1967)
- .. Elion G.B., Nelson D.J.:
Ribonucleotides of allopurinol and oxipurinol in rat
tissues and their significance in purine metabolism.
in: Advances in Experimental Medicine and Biology.
Vol.41 B. Purine metabolism in man.
Ed. by Sperling O., De Vries A., Wyngaarden J.B.
Plenum Press New York, London p. 639-651 (1974)
4. Elion G.B., Yü T-F, Gutman A.B., et al.:
Renal clearance of oxipurinol, the chief metabolite
of allopurinol.
Ann. J. Med. 45,69-77 (1968)
5. Rundles R.W., Wyngaarden J.B., Hitchings G.H.,
Elion G.B.:
Drugs and uric acid.
Ann. Rev. Pharmacol. 9,345-362 (1969)

6. Rundles R.W., Wyngaarden J.B., Hitchings G.H.,
Elion G.B., Silberman H.R.:
Effects of a xanthine oxidase inhibitor on thio-
purine metabolism, hyperuricemia and gout.
Trans. Ass. Amer. Physicians 76,126-140 (1963)
7. Rundles R.W., Metz E.N., Silberman H.R.:
Allopurinol in the treatment of gout.
Ann. Intern. Med. 64,229-258 (1966)
8. Delbarre F., Amer B., Anscher C., De Gery A.:
Treatment of gout with allopurinol, a study of
106 cases.
Ann. Rheum. Dis. 25,627-633 (1966)
9. Hitchings G.H.:
Effects of allopurinol in relation to purine
biosynthesis.
Ann. Rheum. Dis. 25,601-607 (1966)
10. Fox J.H., Wyngaarden J.B., Kelley W.N.:
Depletion of erythrocyte phosphoribosylpyrophosphate
in man, a newly observed effect of allopurinol.
New Engl. J. Med. 283,1177-1182 (1970)
11. Kaiser W., Stocker K.:
Purine and pyrimidine biosynthesis in neurospora
crassa and human skin fibroblasts. Alteration by
ribosides and ribotides of allopurinol and oxipurinol.
in: Advances in Experimental Medicine and Biology.
Vol. 41 B.
Purine metabolism in men. Ed. by Sperling O., De Vries A.,
Wyngaarden J.B., Plenum Press New York, London, p. 629-635
(1974)

12. McCollister R.J., Gilbert W.R., Ashton D.H.,
Wyngaarden J.B.:
Pseudofeedback inhibition of purine synthesis by
6-mercaptapurine ribonucleotide and other purine
analogues.
J. Biol. Chem. 239,1560-1563 (1964)
13. Kelley W.N., Wyngaarden J.B.:
Effect of allopurinol and oxipurinol on purine
synthesis in cultured human cells.
J. Clin. Invest. 49,602-609 (1970)
14. Wyngaarden J.B., Rundles R.W., Metz E.N.:
Allopurinol in the treatment of gout.
Ann. Intern. Med. 62,842-847 (1965)
15. Zöllner N.:
Eine einfache Modifikation der enzymatischen Harn-
säurebestimmung. Normalwerte in der deutschen Be-
völkerung.
Z. Klin. Chem. I, 178 (1963)
16. Endeke R., Lettenbauer G.J.:
Hochdruckflüssigkeitschromatographische Bestimmung
von Allopurinol und Oxipurinol im Serum.
Journal of Chromatography, 115,228-231 (1975)
17. Rodnan G.P., Robin J.A., Tolchin S.F., Elion G.B.:
Allopurinol and Gouty Hyperuricemia, Efficacy of a
single daily dose.
J. Amer. Med. Ass. 231, 1143-1147 (1975)

LEBENS LAUF

Am 27. November 1948 wurde ich, Raimund Wiesbeck, als Sohn des Monteurs Max Wiesbeck und seiner Ehefrau Maria in München geboren. Vom September 1955 an besuchte ich vier Jahre lang die Volksschule, ab September 1959 das humanistische Maximiliansgymnasium in München, an dem ich im Juni 1969 die Reifeprüfung ablegte. Nach einem Semester Wartezeit, während dem ich an der juristischen Fakultät der Universität München eingeschrieben war, begann ich das Medizinstudium in München im Sommersemester 1970. Nach fünf Semestern legte ich dort die ärztliche Vorprüfung ab, am 23. Juni 1976 schloß ich das Medizinstudium mit dem Staatsexamen ab. Seit dem 12. September 1975 bin ich mit Birgit Roth, Studentin der Erziehungswissenschaften, verheiratet. Seit 1. September 1976 arbeite ich im Kreiskrankenhaus Landau/Isar als Medizinalassistent an der chirurgischen Abteilung.

